

POLA PERTUMBUHAN DAN TOKSISITAS BAKTERI RESISTEN HgCl₂ *Ochrobactrum* sp. S79 dari CIKOTOK, BANTEN

Hartati Imamuddin
Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi-LIPI

Abstrak

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui konsentrasi HgCl₂ dan pH optimum terhadap pertumbuhan isolat terpilih.. Isolat resisten diperoleh dengan cara mengisolasi tanah PETI dari Cikotok dan uji kualitatif dengan metoda disk blank. Toksisitas isolat resisten dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat tersebut dalam media yang mengandung HgCl₂ dengan konsentrasi dari 10-90 ppm. Dari isolasi isolat resisten HgCl₂ dari 27 lokasi diperoleh 19 isolat resisten yang dominan, setelah itu dilakukan pengujian daya hambat hanya diperoleh 17 isolat yang tahan HgCl₂ berkisar dari konsentrasi 5 – 90 ppm. Identifikasi bakteri dilakukan dengan 16S rDNA. Pengujian toksisitas isolat *Ochrobactrum* sp. S79 hanya sampai konsentrasi HgCl₂ 70 ppm dan pengaruh pH terhadap pertumbuhan *Ochrobactrum* sp. S79 ternyata pada pH <5 menghambat pertumbuhan isolat pada konsentrasi 10 ppm HgCl₂.

PENDAHULUAN

Obat-obatan, antibiotik dan substansi radioaktif mengandung logam berat yang menyebabkan mutagenik, karsinogenik dan teratogenik demikian juga halnya dengan limbah industri seperti penambangan emas mempunyai pengaruh yang merusak terhadap makhluk hidup (Blaudez, 2000, Seeber, 2002, Akermoun, 2002). Merkuri merupakan salah satu polutan yang ada di lingkungan yang sangat toksik. Merkuri bersifat mutagenik, penghambat pertumbuhan dan mempunyai pengaruh toksik dan dapat menyebabkan penyakit serius terhadap manusia. (Meyer-Baron, 2002). Disamping manusia, tumbuhan dan hewan merkuri juga berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri, tetapi beberapa bakteri dapat tumbuh/tahan pada lingkungan yang mengandung merkuri tinggi (Iwa-

hari, 2000). Di Cikotok penambangan liar (PETI) masih juga ada dan menggunakan merkuri sebagai pemisah emas dan batuan sehingga sangat membahayakan lingkungan.

Dalam merkuri ditemukan dalam 3 bentuk ; metalikmerkuri (Hg⁰), mekurius merkuri (Hg) dan merkurik merkuri (Hg²⁺). Senyawa merkuri mempunyai karakteristik dapat merusak membran dan menonaktifkan enzim periplasma dan sitoplasma dalam sel. Metil-merkuri juga merupakan bentuk yang sangat toksik terhadap organisme hidup. Tidak seperti metil-merkuri HgCl₂ merupakan merkuri yang relatif kurang toksik pada membran. (Benoit et al, 2001, Lovely, 2001). Reduksi dari Hg (II) menjadi Hg (0) dapat dilakukan oleh bakteri resisten dengan enzim merkuri reduktase pada konsentrasi rendah merkuri. Telah terbukti pula bahwa aktivitas mikroba dapat meng-

hasilkan gas merkuri (Hg⁰). (Bizily, 1999) Dalam merkuri ditemukan dalam 3 bentuk ; metalik merkuri (Hg⁰), merkuri merkuri (Hg) dan merkuri merkuri (Hg²⁺). Senyawa merkuri mempunyai karakteristik dapat merusak membran dan menonaktifkan enzim periplasma dan sitoplasma dalam sel. Metil-merkuri juga merupakan bentuk yang sangat toksik terhadap organisme hidup. Tidak seperti metil-merkuri HgCl₂ merupakan merkuri yang relatif kurang toksik pada membran. (Lovely, 2001). Reduksi dari Hg (II) menjadi Hg (0) dapat dilakukan oleh bakteri resisten dengan enzim merkuri reduktase pada konsentrasi rendah merkuri. Telah terbukti pula bahwa aktivitas mikroba dapat menghasilkan gas merkuri (Hg⁰). (Bizily, 1999)

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sejauh mana hubungan antara bekas penambangan emas liar (PETI) yang menggunakan merkuri sangat tinggi dengan isolat-isolat resisten merkuri diperoleh dari daerah tersebut. Disamping itu juga dilakukan pengujian toksisitas HgCl₂ terhadap isolat terpilih.

BAHAN DAN METODA

Isolasi Awal Bakteri Resisten

Isolasi dilakukan dari sample tanah dan air yang berasal dari Pertambangan Emas Cikotok dan Pongkor. Isolasi dilakukan dengan pengenceran berseri dengan metode plate count media yang digunakan untuk isolasi ditambahkan 5 ppm HgCl₂ (Pongkor) dan 10 ppm HgCl₂ (Cikotok)

Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri dilakukan dengan 16S rDNA partial menunjukkan isolat L7T03 adalah *Ochrobactrum* sp. S79 (99%)

Pengamatan Daya Hambat Isolat Terhadap Logam Berat

Untuk pengujian daya hambat dipilih 19 isolat dari populasi terbesar, diharapkan dari populasi tersebut didapatkan isolat yang mempunyai resistensi tinggi terhadap logam berat merkuri (HgCl₂). Isolat-isolat tersebut ditumbuhkan dalam media cair Nutrient Broth selama dua hari, kemudian dipipet sebanyak 0,5 mL ditetaskan dan diratakan dengan spatula steril pada cawan petri yang telah berisi media padat Muller Hinton. Disk blank direndam selama lima menit dalam larutan logam berat dengan konsentrasi 0,10,20,25,30,40,50,60,70,80,90 dan 100 ppm, kemudian diletakkan pada cawan petri yang telah diinokulasi dengan bakteri resisten, setelah itu diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam. Pengamatan zona bening dilakukan dengan cara mengukur diameter dari zona yang terbentuk. (Dutka B.J. and G. Bitton. 1989.).

Pengujian Toksisitas isolat *Ochrobactrum* sp S79

Pembuatan suspensi isolat *Ochrobactrum* sp S79 dilakukan dengan cara menumbuhkan 1 ose kedalam media cair Luria Bertani setelah tumbuh, dipipet 3 ml dimasukkan ke dalam 147 mL media cair Luria Bertani. Konsentrasi HgCl₂ yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0,10,20,30,40,50,60,60,70,80,90 dan 125 ppm. Pertumbuhan diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 436 nm.

Pengaruh Toksisitas HgCl₂ 10 ppm pada kisaran pH 4-9

Pembuatan suspensi isolat *OCHROBACTRUM* SP S79 dilakukan dengan cara menumbuhkan 1 ose kedalam media cair Luria Bertani setelah tumbuh, dipipet 3 ml dimasukkan ke dalam 147 mL media cair

Luria Bertani yang telah disesuaikan nilai pHnya, dengan cara menambahkan 1 N HCl untuk pH asam dan 1 N NaOH untuk pH basa. Konsentrasi HgCl₂ yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10 ppm dengan kisaran pH 4, 5, 6, 7 dan 9. Pertumbuhan diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 436 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Resisten HgCl₂

Tabel 1. Jumlah bakteri resisten logam berat Merkuri (10 ppm HgCl₂) dari limbah penambangan emas rakyat (PETI) di Cikotok

Lokasi	Konsentrasi Logam Berat (Hg)	Jumlah bakteri resisten Hg
Sampel Tanah:		
Lumpur sungai titik 0	2,94	44,8 x 10 ⁷
Lumpur sungai titik 1		113,2 x 10 ⁷
Lumpur sungai titik 2		16x 10 ⁷
Lumpur sungai titik 3		15,1 x 10 ⁷
Lumpur sungai titik 4	23,41	41,6 x 10 ⁷
Lumpur sungai titik 5		85,4 x 10 ⁷
Tanah PETI listrik	29,45	11,7 x 10 ⁷
Sampel air:		
Lokasi 6 titik 0	0,169	2,07 x 10 ⁷
Lokasi 6 titik 1		1,08 x 10 ⁷
Lokasi 6 titik 2		4,49 x 10 ⁷
Lokasi 6 titik 3	0,17	3,08 x 10 ⁷
Lokasi 7 titik 0	0,257	2,58 x 10 ⁷
Lokasi 7 titik 1		1,72 x 0 ⁷
Lokasi 7 titik 2		12,92 x 10 ⁷
Lokasi 7 titik 3		13,85 x 10 ⁷
Lokasi 7 titik 4		16,08 x 10 ⁷
Lokasi 7 titik 5	0,198	214,2 x 10 ⁷
Tanah kontrol		0,25 x 10 ⁷

Tabel 2. Jumlah bakteri resisten logam berat Merkuri (5 ppm HgCl₂) dari daerah Pongkor

No	Sampel	Jumlah Bakteri
1	I (Air Sungai Cikaniki)	101,73 x 10 ⁷
2	II (tanah Sungai Cikaniki)	156 x 10 ⁷
3	IV (air sawah, Cikaniki)	78,75x 10 ⁷
4	V (tanah sawah bawah, Cikaniki)	15,1 x 10 ⁷
5	VII (kontrol, tidak tercemar)	139,125 x 10 ⁷
6	IX-X (air bersih, Cigoa dan Bolang)	125,75 x 10 ⁷
7	XI (sedimen tailing pond)	65,04 x 10 ⁷
8	XIII (air sawah dekat tailing)	102,25 x 10 ⁷

Hasil isolasi (Tabel 1 dan Tabel 2) didapatkan 19 isolat bakteri resisten dari daerah penambangan emas Cikotok dan 8 isolat bakteri resisten merkuri dari daerah Pongkor. Dari hasil tersebut dapat dikatakan bahwa sampel yang diambil dari daerah Cikotok mempunyai bakteri resisten lebih tinggi dibandingkan daerah Pongkor, ini

biasa terjadi karena pengambilan sampel Pongkor dari sungai yang jauh dari daerah tercemar merkuri hasil ini sesuai dengan pernyataan Tapan, et al.,1992 dan Shazie et al, 2002 bahwa bakteri yang tahan terhadap logam berat adalah bakteri yang telah lama beradaptasi terhadap lingkungan yang tercemar logam berat .

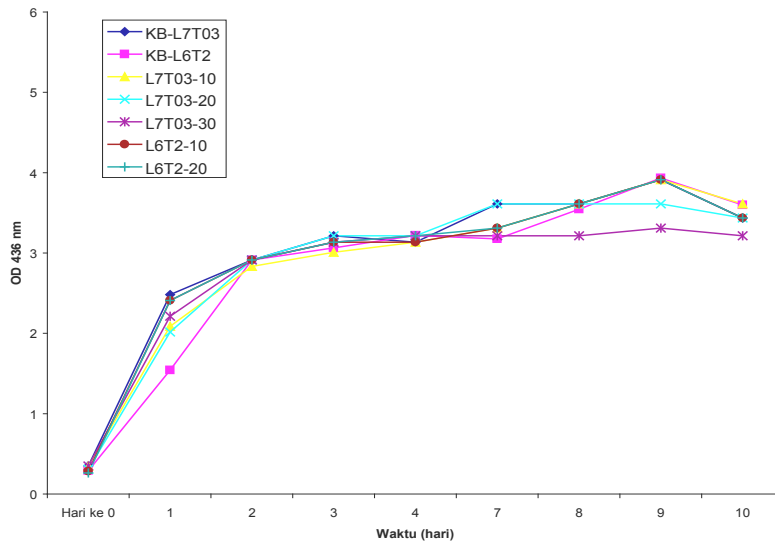
Tabel 3. Hasil uji resitensi secara kualitatif terhadap HgCl₂

No	Isolat	Konsentrasi Hg Cl ₂							
		0	5	10	15	20	30	50	90
1	L6T3-2		+						
2	L7T2-3			+					
3	L6T2-2							+	
4	L6T3-1						+		
5	L6T5						+		
6	L7T5-5	+							
7	L7T0-3								+
8	L7T1-2			+					
9	II-4						+		
10	IV-1						+		
11	IV-2				+				
12	V-2	+							
13	V-3					+			
14	VII						+		
15	IX-X						+		
16	XI-1						+		
17	XI-2						+		
18	XIII						+		
19	XVI						+		

Dari 19 isolat yang diuji resistensinya secara kualitatif didapatkan 2 isolat yang mempunyai resistensi tertinggi (50 ppm dan 90 ppm) 2 isolat tersebut adalah : Ochrobactrum sp S79 dan isolat L6T2 resisten pada 50 ppm sampai 90 ppm HgCl₂ dan isolat-isolat yang lain hanya tahan □ 40 ppm dan adapula yang tidak resisten yakni isolat L7T5-5 dan V2

Pengujian Pertumbuhan Awal Isolat L7TO3

Karena isolat Ochrobactrum sp S79 dan L6T2 mempunyai resistensi yang tinggi pada pengujian secara kualitatif maka isolat-isolat tersebut perlu dilanjutkan dengan uji



Gambar 1. Pertumbuhan 2 isolat resisten pada media yang mengandung HgCl₂

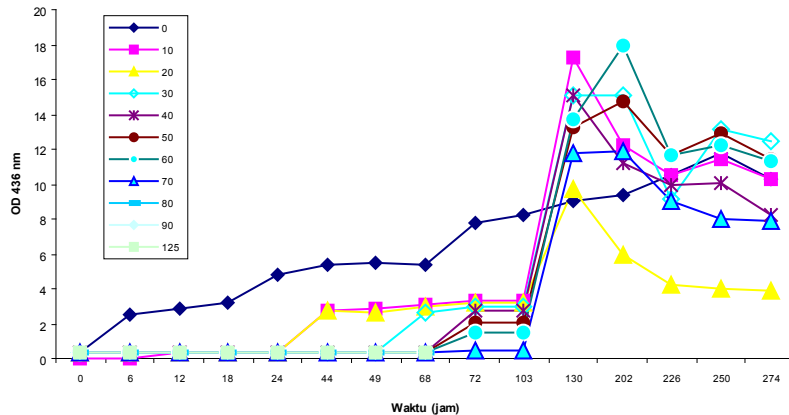
toksisitas terhadap pertumbuhannya pada media cair. Untuk pengujian toksisitas ini kedua isolat tersebut ditumbuhkan pada media yang mengandung HgCl₂ dengan konsentrasi awal (10,20 dan 30 ppm) (gambar 1). Pada gambar 1 dapat dinyatakan bahwa pertumbuhan isolat Ochrobactrum sp S79 pada media Luria Bertani yang mengandung HgCl₂ 10,20 dan 30 ppm terjadi lag phase setelah 36 jam dan terjadi perbedaan pada fase stationer setelah inkubasi lebih dari 96 jam.inkubasi. Kenyataan ini agak berbeda dengan hasil yang diperoleh Hamdy, 1975 pada konsentrasi Hg₂⁺ lag phase terjadi pada 11 jam setelah inkubasi jadi hasil yang diperoleh pada percobaan ini mempunyai lag phase yang lebih panjang. Bila dibandingkan dengan kontrol

pertumbuhan Ochrobactrum sp S79 masih menunjukkan pertumbuhan yang sama. selama masa inkubasi, demikian juga dengan pertumbuhan isolat L6T2 dengan konsentrasi HgCl₂ 20 ppm.

Pengujian Toksisitas Isolat L7TO3 (Ochrobactrum sp S79)

Dengan hasil tersebut di atas perlu dilakukan pengujian toksisitas yang lebih tinggi terhadap pertumbuhan isolat L7TO3 (Ochrobactrum sp S79) dengan tujuan untuk mengetahui sejauh mana isolat tersebut tahan terhadap logam berat HgCl₂ Pada pengujian ini isolat L7TO3 ditumbuhkan

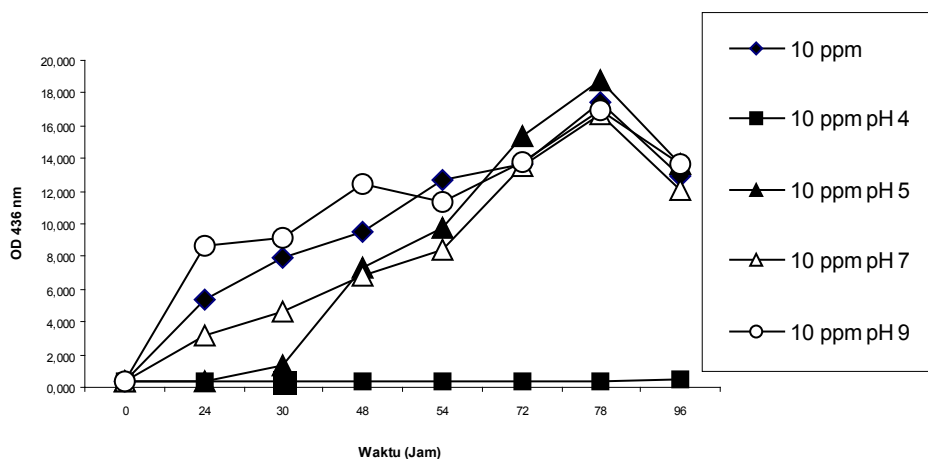
pada konsentrasi 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm dan 70 ppm, 80 ppm, 90 dan 125 ppm. Hasilnya dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Toksisitas Isolat L7TO3 Terhadap HgCl2

Pengujian toksisitas dengan konsentrasi 70 ppm HgCl2 isolat tersebut masih tumbuh baik hingga mencapai OD= 17,900 pada konsentrasi 60 ppm, sedangkan pada konsentrasi 20 ppm pertumbuhannya kurang bagus kemungkinan terkontaminasi oleh bakteri lain karena warna media berubah menjadi kehijauan. Dengan penambahan konsentrasi HgCl2 menjadi 80 ppm,

90 ppm dan 125 ppm pertumbuhan isolat L7TO3 mulai terhambat ini ditunjukkan dengan tidak adanya perubahan nilai OD dari awal inkubasi sampai inkubasi ke 103 jam OD yang dicapai hanya mencapai 0,3. Jadi dapat disimpulkan bahwa toksisitas isolat L7TO3 hanya sampai konsentrasi HgCl2 70 ppm. (Gambar 2)



Gambar 3. Toksisitas 10 ppm HgCl2 Terhadap Isolat L7TO3 pada pH 4-9

Pengujian toksisitas isolat L7TO3 terhadap perubahan pH

Disamping itu juga dilakukan pengujian pengaruh konsentrasi HgCl₂ 10 ppm pada pH (4, 5, 5, 6, 7, 8 dan 9) terhadap pertumbuhan isolat *Ochrobactrum* sp S79. Hasilnya dapat dilihat pada gambar 3

Pengujian toksisitas isolat L7TO3 (*Ochrobactrum* sp S79) terhadap perubahan pH pada konsentrasi HgCl₂ 10 ppm menunjukkan bahwa isolat tersebut tidak tahan/resisten terhadap pH 4 artinya dengan pH asam toksisitas akan meningkat ataupun isolat tersebut tidak tahan terhadap pH rendah, semakin meningkat pH semakin baik pertumbuhannya. Pada pH 5 awalnya lambat pertumbuhannya kemudian meningkat pada jam ke 48 dan mencapai puncak pada jam ke 78. Pada pH 7 pertumbuhannya relatif di bawah kontrol sampai akhir pengamatan dan pH 9 awalnya lebih baik dari kontrol dan menurun jam ke 54. Dari percobaan ini dapat disimpulkan bahwa isolat L7TO3 hanya dapat tumbuh pada pH 5 sampai 9 dan tidak dapat tumbuh pada pH 4 pada konsentrasi HgCl₂ 10 ppm.

KESIMPULAN

Dari percobaan ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Dari 19 isolat yang diuji resistensinya secara kualitatif didapatkan 2 isolat yang mempunyai resistensi tinggi yakni *Ochrobactrum* sp S 79 dan L6T2
2. Toksisitas *Ochrobactrum* sp. S79 mencapai konsentrasi HgCl₂ 70 ppm, konsentrasi yang lebih tinggi pertumbuhan menurun
3. *Ochrobactrum* sp. S79 hanya mampu tumbuh pada pH 5 sampai 9 dan tidak dapat tumbuh pada pH 4 pada konsentrasi 10 ppm HgCl₂

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada proyek SDH Puslit Biologi yang telah mendanai penelitian ini. Penulis sampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Dra Sulistiani M Kes yang telah mengidentifikasi isolate L7TO3. Juga Sdri Nani, Ety dan Ary yang telah membantu dalam penelitian ini dan teman-teman semua yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu.

DAFTAR PUSTAKA

- Akermoun, M., E. Testet, C. Cassagne and J.J. Bessoule, 1998. Gram-negative mercury resistant bacteria exhibiting mercury detoxification ability in growth medium. *Biologia*, 44 : 33- 45
- Blaudez, D, B. Botton and M. Chalot, 2000. Effects of heavy metals on nitrogen uptake by mycorrhizal birch seedlings. *FEMS Microbiol. Ecol*, 33 : 61-67
- Bizily, 1999 dalam Jaysankar De, 2004. Mercury-resistant Marine Bacteria and Their Role In Bioremediation of certain Toxicants. National Institute Of Oceanography. Dona Paula, Goa. India
- Dutka B.J. and G. Bitton. 1989. Toxicity Testing Using Microorganisms. Vol. II. CRC Press, Inc. Boca Raton. Florida.
- Hamdy, M.K and O.R. Noyes. 1975. Formation of Methyl Mercury by Bacteria. *App Microbiology*. Vol 30. No 5. pps : 424-432
- Lovely, 2001 dalam Jaysankar De, 2004. Mercury-resistant Marine Bacteria and Their Role In Bioremediation of certain Toxicants. National Institute Of Oceanography. Dona Paula, Goa. India
- Tapan K. Misra. 1992. Heavy Metals, Bacterial Resistances. *Encyclopedia of Microbiology* Vol II. Academic Press. Inc.v